

拒絶理由通知書

8624-NOVO
田中/須

特許出願の番号

特願昭 59-183881

特許庁審査官

後藤 圭次

7329

起案日 平成 1年 6月20日
発送日 平成 1年 7月25日

出願人代理人

青 木 朗 他4名 殿

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものと認める。これについて意見があれば、この通知書の発送の日から 3月 以内に意見書を提出されたい。

理 由

この出願の特許請求の範囲第14項、第1～10項、第11、12、13項に記載された発明は、その出願前 国内において頒布された下記 イ、ロの刊行物に記載された発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が、容易に発明をすることができたものと認められるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。

記

(イ) 特開昭58-40086号公報

(ロ) 特開昭54-76892号公報

リパーゼを担体に固定化し、これを乾燥することが引用例(イ)に記載されている。引用例(イ)では担体として特に陰イオン交換樹脂に言及していないが、リパーゼの固定化担体に陰イオン交換樹脂を用いることが引用例(ロ)に見られるように本出願前知られていることからすると、本発明は引用例(イ)から当業者が容易に想到し得たものと認められる。

拒絶理由通知書（特許）注意書

- 提出書類について
(イ) 意見書：審査官が示した拒絶理由に対して意見がある場合に提出するものです。
(ロ) 手続補正書：明細書又は図面を補正する必要がある場合に提出するものです。
- 提出書類の様式及び作成要領について
意見書及び手続補正書は、特許法施行規則第32条様式第18（様式（1）参照）及び同第11条様式第5（様式（2）参照）によって作成して下さい。
- 封筒面への表示
郵送によって提出するときは、封筒表面左下に在中書類名を記載して下さい。
（例、意見書及び手続補正書在中）
- 住所欄には、郵便番号及び電話番号も記入して下さい。
- 拒絶理由に引用した文献について
(イ) 特許（実用新案・意匠）公報の閲覧
万国工業所有権資料館（特許庁内）、各地方通商産業局、発明協会支部及び全国主要図書館で閲覧することが出来ます。
(ロ) 拒絶理由に引用した文献の複写を請求することが出来ますが、日本特許情報機構でも、これらの文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に文献の複写物を請求するときは、次の点に注意して下さい。

【申込方法】
(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記して下さい。

- 特許・実用新案及び意匠の種類
・出願公告、出願公開又は国内公表の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）
・必要部数
- 公報以外の文献の場合は、次の点に注意して下さい。（返却します）
・拒絶理由通知書の写しを添付して下さい。（返却します）
- 先願として引用された明細書の場合は、次の点に注意して下さい。（返却します）
・拒絶理由通知書を添付して下さい。（返却します）
・日本特許情報機構宛の、「先願明細書の閲覧及び複写についての委任状」を提出して下さい。

【申込及び照会先】
〒105 東京都港区虎ノ門2丁目9番14号 発明会館内 情報普及部
財団法人 日本特許情報機構 発明会館内支部
TEL 03-504-2351

様 式（2）

| 様 式（1） | | 様 式（2） | |
|---|--|--|--|
| <p>意見書</p> <p>平成 年 月 日</p> <p>特許庁審査官 殿</p> <p>号</p> <p>1 事件の表示 平成 年特許願第</p> <p>2 発明の名称</p> <p>3 特許出願人 住所（居所） フリガナ 氏名（名称）</p> <p>4 代理人 住所（居所） 氏名（名称）</p> <p>5 拒絶理由通知の日付 平成 年 月 日</p> <p>6 理 由</p> <p>7 証拠方法</p> <p>8 添付書類又は添付物件の目録</p> | | <p>手 続 補 正 書</p> <p>平成 年 月 日</p> <p>特許庁長官 殿</p> <p>1 事件の表示 平成 年特許願第</p> <p>2 発明の名称</p> <p>3 補正をする者 事件との関係 特許出願人 住所（居所） フリガナ 氏名（名称）</p> <p>4 代理人 住所（居所） 氏名（名称）</p> <p>5 補正命令の日付</p> <p>6 補正（昭和62年以前の出願または、昭和62年以後の発明の出願であつて、昭和62年以前の出願であつては、昭和62年以前の出願については、それが認められた出願については、その数にかえて発明の数とする）</p> <p>7 補正の対象</p> <p>8 補正の内容</p> | |

⑫Int. Cl.³
C 07 G 7/02

識別記号 ⑬日本分類
1 0 2 36(2) C 2
1 1 2 36(2) C 05

庁内整理番号 ⑭公開 昭和54年(1979)6月19日
6956-4H
6956-4H

発明の数 1
審査請求 有

(全 4 頁)

⑮脂質分解酵素の不溶化方法

⑯特 願 昭52-143037
⑰出 願 昭52(1977)11月29日
⑱発 明 者 小杉佳次
千葉市稲毛東5丁目8番1号
工業技術院微生物工業技術研究
所内
同 鈴木英雄
千葉市稲毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究
所内
⑲発 明 者 上林明
千葉市稲毛東5丁目8番1号
工業技術院微生物工業技術研究
所内
⑳出 願 人 工業技術院長
㉑指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究
所長

明 細 書

1. 発明の名称
脂質分解酵素の不溶化方法
2. 特許請求の範囲
(1) 疎水基を有するイオン交換体に脂質分解酵素をイオン結合及び疎水性結合で結合させることを特徴とする脂質分解酵素の不溶化方法。

3. 発明の詳細な説明
本発明は、脂質分解酵素を容易に不溶化し、かつ反応中の酵素の離脱を防ぐために、疎水基を有するイオン交換体に脂質分解酵素をイオン結合及び疎水性結合で結合させることよりなる脂質分解酵素の不溶化方法に関する。

従来、酵素の不溶化法としてDEAEセルロースなどにイオン吸着させるイオン結合法がひろく行なわれている。このイオン結合法は不溶化の方法が簡単で、不溶性酵素の活性がなくなった場合その再生が容易であり、また担体が反復使用できるなどの利点を有するが、一方、このイオン結合

法による不溶性酵素はpH変化やイオン強度の変化により酵素の離脱が起るなどの欠点をも有する。脂質分解酵素は疎水基と親水性を持ち、疎水基に吸着した脂質分解酵素はそれ自身不溶性酵素としての機能を発現する。この場合、疎水性結合は酸性の緩衝液やイオン強度の高い緩衝液にありとかがえって強まる傾向を有する。この疎水性結合による不溶性酵素も再生が容易であり、担体が反復使用できるなどの利点を有する。

本発明者らは、担体が反復使用できしかもイオン結合法と疎水性結合法の欠点を補ないような脂質分解酵素の不溶化法を開発すべく鋭意研究した結果、脂質分解酵素を疎水基を有するイオン交換体に結合させれば容易に不溶化でき、pHやイオン強度の変化による脂質分解酵素の離脱も起らず、しかも担体の再使用が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明に用いる疎水基を有するイオン交換体の疎水基とは、疎水性残基が親水性残基より多い重合物の残基をいい、脂肪族、芳香族、複素環族、脂

脂族などいずれでもよく、特に脂肪族炭化水素などの脂肪族化合物、ベンゼンなどの芳香族化合物、デオキシコリクアシッドなどの脂環式化合物が誘導される基が好ましい。

また、本発明におけるイオン交換体としては種々のものが用いられるが、上記の疎水基に、アミノ基、アミノフェニル基、グアニドアルキル基などの塩基含有基をもつ陰イオン交換体が特に好ましい。その理由は、多くの場合脂質分解酵素の等電点がpH 4～7にある酸性蛋白であり、また脂質分解酵素反応を行なわせるpHは5～9付近にあることから、もし不溶性脂質分解酵素を使用する際のpHが等電点以下であるならば、疎水基にカルボキシル基などのついた陽イオン交換体を用いなければならないためである。

本発明における脂質分解酵素がイオン結合していることは、遊離の荷電基の種類と、その脂質分解酵素の等電点及び不溶性酵素を使用したpHによってわかる。たとえば等電点が4.5のものをpH 7で使用する場合、脂質分解酵素は負に荷電

- 3 -

解酵素と同等かもしくは安定性が増加する。pH反応性や温度反応性は用いる脂質分解酵素によって多少の差はみられるが、ほぼ可溶性の脂質分解酵素の反応性と同等である。

本発明の脂質分解酵素を不溶化させる処理操作は、たとえば次のようにして容易にできる。すなわち、疎水基を有するイオン交換体に脂質分解酵素を適当な条件で接触させれば脂質分解酵素は吸着される。未吸着の脂質分解酵素はろ過等により取り除き、イオン強度の高い酸やアルカリの硬水液で洗浄して単なる物理的吸着などで吸着している脂質分解酵素を除去すれば、反応中に離脱する脂質分解酵素量は著しく少なくなる。

本発明により調製された不溶性脂質分解酵素を作用させるにはカラム法やバッチ法がある。カラム法では不溶性脂質分解酵素をカラムにつめ、脂質溶液を上昇させたり下降させたりすればよい。一回のカラム通過で適当な分解率が得られない場合には何度もカラムを通過させる。バッチ法では不溶性脂質分解酵素を含む反応液をかく拌しながら

- 5 -

特開 昭54-76892(2)
しているので遊離のアミノ基などを有する陰イオン交換体にイオン結合したものを使用しなければならぬことになる。

本発明における脂質分解酵素が疎水結合していることは、イオン強度を高めても、pHを変化させても脂質分解酵素が離脱せず、界面活性剤などによりわずかに離脱することから明らかである。なお、脂質分解酵素が各種の疎水基と疎水結合することは本発明者らがすでに報告していることである（米国特許第4013512号明細書(1977.5.22)参照）。

本発明に用いるイオン交換体を製造するには、アガロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリステレン、ナイロン、ガラスなどの高分子物質に荷電基をもつ疎水基を化学結合させればよい。これらの高分子物質は、脂質分解酵素のような高分子物質を不溶化する場合、疎水性構造を持つのでより望ましい不溶性担体である。

本発明により不溶化した脂質分解酵素は、そのpH安定性及び熱安定性において可溶性の脂質分

- 4 -

ら反応させる。なお、かく拌は不溶性脂質分解酵素を摩耗しないよう注意する必要がある。

反応後の不溶性脂質分解酵素は、ろ過あるいは遠心分離によって反応液から分離する。長鎖の脂質分解酵素が脂質エマルジョンの表面に吸着して容易に分離しない場合があり、このようなときには50℃程度の温度で遠心分離するとよい。

回収した不溶性脂質分解酵素は再使用が可能である。再使用の際活性が充分量ないときには、既使用の不溶性脂質分解酵素に前記のようにして脂質分解酵素を再び吸着させてやればよい。

以上述べたように本発明の方法を用いれば、脂質分解酵素が容易に不溶化でき、しかも脂質分解酵素がイオン結合法や疎水性結合だけの場合より強固に吸着されているからイオン強度の変化やpHの変化では溶出せずかつ不溶性脂質分解酵素の再生も容易である等々優れた利点を有するので、本発明の方法は工業的な脂質分解酵素の不溶化法として最適である。

また疎水基と親和性のある酵素は脂質分解酵素

- 476 -

- 6 -

ばかりでなく、キモトリプシン、リゾチーム、グリコーゲンシンターゼ、グリコーゲンホスホリラーゼなど多くの酵素が知られていることから、これらの酵素の不活化においても、疎水基を有するイオン交換樹脂で不活化すれば前述したような有効な結果が期待される。

以下実施例によりさらに詳細に説明するが本実施例は単なる例示であって何ら本発明を限定するものではない。

実施例 1

ブロムシアンで活性化したアガロース 6.8 ml と 1 g の 1, 12-ジアミノドデカンとを、0.5 M の食塩を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム液とジオキサン 1:1 混液 10 ml に分散させて、室温で 24 時間反応させたのち、前記混液、0.5 M の食塩を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム液、及び 0.1 M 酢酸液で順次洗い、1, 12-ジアミノドデカン・アガロースを合成した。

上記のようにして合成したアガロースゲル 2 ml を 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5 に平衡化し、脂質分

- 7 -

を 20 分間 60°C で反応させ、反応終了後不活化したゲルを遠心分離して回収し、5 回反復使用したが各回とも 0.1 M のトリブチリンが分解されていた。また反応終了後の反応液には脂質分解酵素は検出されなかった。

実施例 2

ブロムシアンで活性化されたアガロース 6.8 ml と、1 g の 1, 10-ジアミノデカンとを、0.5 M の食塩を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム液とジオキサンの 1:1 混液 10 ml に分散して室温で 24 時間反応させたのち、前記混液 0.5 M の食塩を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム液、及び 0.1 M 酢酸液で順次洗い、1, 10-ジアミノデカン・アガロースを合成した。不活化された酵素量に対する発現された酵素量の割合は 3.3 多であった。

上記のようにして合成したアガロースゲル 2 ml を 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5 に平衡化し、脂質分解酵素液を吸着させ、0.1 M のリン酸緩衝液 pH 5 で洗浄し、1, 10-ジアミノデカン・アガロースに吸着した不溶性リパーゼ A を調製した。

- 9 -

特開昭54-76892(3)

解酵素液 4 ml / 280 単位を吸着させた。なお脂質分解酵素はシェウドモナス・メフィディカ・バリエタス・リボリチカ（微工研菌第 520 号）の菌体外に生産するリパーゼを使用し、リパーゼ活性度の測定はノード（Nord）らの変法（山田他、日農化、36, 860, 1962）に準じて行ない、不溶性酵素を測定する場合には振とうしながら測定した。

吸着させた脂質分解酵素を 0.1 M のリン酸緩衝液 pH 5 で洗浄すると 68 単位のリパーゼが溶出した。不活化された 212 単位のリパーゼは 0.5 M の食塩を含む pH 8.5 の緩衝液でも、0.5 M の食塩を含む pH 4.3 の緩衝液で洗浄しても、洗浄液には脂質分解酵素の活性は認められなかった。この不溶性脂質分解酵素はそれ自身 74 単位の活性量を示し、不活化された酵素量に対する発現された酵素量の割合は 3.5 多であった。

上記のようにして不活化したゲルの懸濁液 3.5 ml、トリブチリン 1.5 g、0.5 M の酢酸緩衝液（pH 6）2 ml および水 3 ml からなる反応混合物

- 8 -

また比較のため、DEAE セルロース 2 ml を 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5 に平衡化し、脂質分解酵素を吸着させ、0.1 M のリン酸緩衝液 pH 5 で洗浄し、DEAE セルロースに吸着した不溶性リパーゼ B を調製した。不活化された酵素量に対する発現された酵素量の割合は 3.1 多であった。

上記のようにして調製した不溶性酵素及びトリブチリン 0.3 g、0.5 M の酢酸緩衝液（pH 5）2 ml を水で全量 10 ml とし、かく拌しながら 50°C で 2.5 時間反応させた。反応終了後、遠心分離によって不溶性酵素を回収し次の反応に供した。反復使用中の残存活性の変化は次表の通りであった。

- 477 -

- 10 -

第 1 表

特開 昭54-76892(公)

| | 不溶性リパーゼA の残存活性 | 不溶性リパーゼB の残存活性 |
|------|-------------------|-------------------|
| 開 始 | 100 | 100 |
| 1回使用 | 64 | 40 |
| 3 " | 59 | 33 |
| 5 " | 54 | 35 |
| 7 " | 56 | 30 |

この結果から疎水基を有する陰イオン交換体
不溶化させた不溶性リパーゼAは、単なるイ
交換体に結合した不溶性リパーゼBよりも残存活
性が高いことがわかった。

指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所
御 函 光 顧

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭58—40086

⑫ Int. Cl.³

C 12 N 9/98

// A 61 K 37/54

C 12 N 9/18

識別記号

庁内整理番号

7421—4B

7138—4C

7236—4B

⑬ 公開 昭和58年(1983)3月8日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 酵素剤の製造法

⑮ 特 願 昭56—137254

⑯ 出 願 昭56(1981)8月31日

⑰ 発 明 者 松尾高明

泉南市信達岡中973番地の34

⑱ 発 明 者 沢村紀夫

大阪府泉南郡熊取町五門28—10

⑲ 発 明 者 橋本征雄

岸和田市東が丘808—399

⑳ 発 明 者 橋田度

大阪市旭区生江3丁目7—16

㉑ 出 願 人 不二製油株式会社

大阪市南区八幡町6番1

㉒ 代 理 人 弁理士 門脇清

明 細 書

1 発明の名称 酵素剤の製造法

2 特許請求の範囲

(1) 脂質分解酵素を担体とともに水和し、エステル交換活性 (K_r値) を賦与乃至増大せしむるに充分緩慢な乾燥速度で、これを乾燥 (減圧手段による場合を除く) することとを特徴とする酵素剤の製造法。

(2) (K_r値) の賦与乃至増大が 0.005 以上である特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3 発明の詳細な説明

この発明は、エステル交換活性の高い酵素剤、特に乾燥した系中において該活性を呈する酵素剤及びその製造法に関するものである。

脂質分解酵素は、飼料、酵素フレーバー、皮なめし、洗剤、化粧品、腐蝕、グリセリドの製造分析等多くの用途が開発され利用されている。これらの用途は酵素が脂質を分解する性質に依るものであることから明らかな通り、一般に酵素の脂質を分解する力価 (脂質分解活性) が、酵素

の価格を左右し或いは酵素調製における当然の尺度となっている。

ところで、近年脂質分解酵素のエステル交換への利用に注目した研究が盛んされるようになり、本発明者もそれに携わって来たが、脂質分解酵素によるエステル交換には水が必要であること、すなわちエステル交換反応は分解反応と合成反応の可逆反応の結果で分解反応を前提とすること、との考え方が当初からあり、従ってそこにおいても酵素のとり扱いは従来通り脂質分解活性を重要な尺度の一つとしていた。

しかし、本発明者は上述の研究を進める中で、エステル交換を利用して得る目的物によっては、反応系の水分をむしろ可及的に低下させることの重要性と、それによって生じる反応速度の低下をカバーする別の方法の検討が必要であることに想到した。そして、脂質分解活性のある酵素でも、特に系の水分が低いときには、エステル交換を行う能力がほとんどないものが少なくないこと、或いはエステル交換の活性を示す同ロットの酵素から

利用し易い原料を数種四製した際に、原料の脂質分解活性が同等であるにもかかわらず、酵素のエステル交換を行う活性は異なることがあること等脂質分解活性とエステル交換活性の不相応の現象を見出し、エステル交換活性についての明確な概念規定の検討と、特に水分の低い系でも恒常的に高いエステル交換活性を示す酵素剤を得る方法について研究を進め、遂には既存の酵素には認められないエステル交換高活性の酵素剤を調製できることを見出すにいたり、酵素剤及びその製造法についての提案を行った（特願昭55-29707）。

すなわち先の発明は、既存の酵素では見しなかったエステル交換高活性の酵素剤に関するものであり、また、脂質分解酵素を担体とともに水相し、これを充分緩慢な初期速度で減圧乾燥することを骨子とするエステル交換活性を試法乃至増大させた酵素剤の製造法に関するものである。

しかしながら、本発明者は、さらに検討を進める中で、上記乾燥は、充分緩慢な初期速度で乾燥するという条件を満足する限り、減圧手段のみに

依存する必要はなく、より広範な手段を採用し得ることを見出した。

すなわち、この発明は、脂質分解酵素を担体とともに水相し、エステル交換活性（ K_r 値）を試法乃至増大せしむるに充分緩慢な乾燥速度で、これを乾燥（減圧手段による場合を除く）することを骨子とする酵素剤の製造法である。

以下この発明を説明するが、まずエステル交換活性について説明する。

すなわち、一般に反応率が x （但し完全に反応した状態が1、未反応の状態を0）、反応時間が t で、反応速度 dx/dt は $(1-x)$ に比例するとして、比例定数 $k = \frac{1}{t} \ln \frac{1}{1-x}$ である。エステル交換を行なわせる反応系は低水分とし、エステル交換活性の測定は、適当な標識脂肪酸を定め、その分布状況を確認することにより行なうこととする。ここで「完全に反応した状態」とは、充分な反応時間をとって脂肪酸分布が実質的に一定した状態のことをいうが、酵素の特異性の有無及びその内容が明らかであるときは、理論的に「完全に反応

した状態」を設定する方が簡便であり、また支障がない。例えば、グリセリドの1、3位に対して選択的に作用する（2位に対して作用しない）ことが明らかな酵素を用いるとき、グリセリドの2位を除く脂肪酸分布が完全にランダム化した状態をもって「完全に反応した状態」とみなすこととする。そしてエステル交換活性（絶対値） K_a は比例定数 k に基質濃度/酵素剤量を乗じたものとする。エステル交換活性（相対値） K_r は K_a を酵素剤1grの脂質分解活性で k_a を除するものとする。

この発明で、エステル交換活性の標準的測定方法についてより詳細な説明すると次の通りである。

ヤシ油（日本薬局方所収規格）とステアリン酸メチルエステル（主として $C_{17}H_{35}COOCH_3$ 及び $C_{15}H_{31}COOCH_3$ とからなり $C_{11}H_{23}COOCH_3$ を含まない）との等重量混合物（但し水分0.02重量%以下であること）20gr及び、（覆っているものは真空乾燥により可及的水分を下げた）酵素剤1gr（系中水分の合計は 0.08 ± 0.02 %の範囲内）を300ml容の検付マイヤーに仕込み、窒素ガスで空気を

置換後300～500rpmで脱拌しながら40℃で24時間（1日）反応させる。得た反応物を約20%採取し、薄層クロマトグラムに展開して脂肪酸メチルエステル区分を分取し、ガスクロマトグラムによりこの区分の脂肪酸組成を求める。標識脂肪酸はラウリン酸とし、メチルエステル区分における標識脂肪酸の組成割合の値について、完全に反応した状態の値を a 、 $t=1$ （日）における値を b 、 $t=0$ における値を c として、

$x = \frac{b}{a}$ 、 $k = \ln \frac{a}{a-b}$ 、 $K_a = 20 \ln \frac{a}{a-b}$ である。ここで、酵素の特異性が明らかであるときは、前掲例の如くグリセリドの1、3位に対して特異性を有する酵素で例示すると、ヤシ油トリグリセリドの1、3位の反応部位（脂肪酸基）とステアリン酸メチルエステルの反応部位（同）の直値和に対する1、3位に結合しているラウリン酸基の直値割合として求めることができる。また例えばグリセリドの位置に対する選択性が実質的に認められない酵素の場合は、グリセリド及びメチルエステルの全反応部位に対する全ラウリン酸基の割

合として求めることができる。脂質分解活性は使用酵素剤 1gr が毎分生成する脂肪酸の μM で表示するものとし、福本らの、J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 353 (1963) に記載された方法に準じて測定する。

次に酵素剤の製造法について説明する。

原料となる酵素乃至酵素含有物は、脂質分解活性を呈するものを使用する。脂質分解活性を呈してエステル交換活性を呈しないものにはエステル交換活性を賦活できるが、脂質分解活性のないものは、いかに加工してもエステル交換活性を賦活できない。エステル交換反応は少くとも脂質分解活性部位を必要とすると解される。本発明者が入手した市販酵素を検討した限りにおいては、ある種の菌体内酵素のように、弱いながらも少しはエステル交換活性を示すものもあるが、他の脂質分解酵素は単独ではほとんどエステル交換活性を示さない傾向にある。使用する酵素又は酵素含有物の起源、精製度、選択性について特に問うところではなく、起源的には細菌や酵母等の脂質分解酵素

-7-

酵素乃至酵素含有物と担体を配合しこれに水性媒体を噴霧する方法等が適当であるが、水が多すぎるとは、この発明の本質を阻害するものではなく、物理的方法による過剰の水の脱水も可能である。

担体は公知のものの中から選択することができる。ケイソウ土、カオリナイト、パーライト、シリカゲル、セルロースパウダー、炭酸カルシウム等のように保水力が強く且つ吸着能は低い担体は本発明に用いて一般に優れており、優先して使用することができる。吸着能の強い担体や、酵素と結合する担体の中には、エステル交換反応の活性中心となるべき部分を封鎖したり破壊したりすることがあるためか、エステル交換活性の賦活乃至増大の程度が少なかつたり殆んど阻害なものがあるから、吟味して選択するのがよい。また保水力の低い担体は、酵素溶液で担体を水相するのにも多量を必要とする等酵素の担体上への分布が良好でないためか、活性の賦活乃至増大は概して弱い。担体の形態は粉状、繊維状等種々使用でき、また最終的に酵素を包括（エントラップ）する型となる

-8-

特開58-40086(3)

から高等動物の脂質分解酵素まで広く使用できるが、酵素によるエステル交換で選択性が皆無であるとアルカリ金属触媒等を用いるエステル交換反応に対する格別な優位性を見出し難いので、実用的には何らかの選択性、例えばグリセリドに結合する位置の選択性とか、脂肪酸の種類に対する選択性とかを有するものがよい。

脂質分解活性を有する酵素乃至酵素含有物は、まず、担体とともに水和させることが必要であり、酵素を単に乾燥した状態で担体と混合するだけではエステル交換活性が賦活乃至増大されない。ここで水相は水性媒体例えば、水、緩衝液、アセトン水溶液、アルコール水溶液等が、被水相物の全体に行きわたる状態におくことをいい、後の乾燥工程の時間を短くするには、酵素乃至酵素含有物と担体の保水力を越える水性媒体の量は可及的少なくするのが好ましい。このような水が多くなりすぎないための水和の方法としては、酵素乃至酵素含有物を先に水性媒体に溶解し次いで保水性の強い担体を添加混合する方法、乾燥した酵

-9-

ものであってもよいが、製品酵素剤を連続的反応に供する場合は、顆粒状のものを使用するのが操作上簡便である。

酵素乃至酵素含有物と担体の比率は、担体の保水力や用いる酵素力価により異なるが、概ね2対1〜1対20が適している。

担体とともに水和させた酵素剤は次に乾燥するが、この工程は特別の配慮が必要であり、単に脂質分解活性を保持する範囲で可及的速く乾燥する思想では、この発明の目的を到底達することができない。すなわち、前述K_r値を賦活乃至増大せしむるには乾燥初期、すなわち水和状態からある程度水分が低下するまでの乾燥速度を緩慢にすることが必要なのである。K_r値を満足する緩慢な初期速度及び「初期」の期間は、使用した酵素含有物中の酵素以外の成分や、使用される担体の種類、担体の状態、及び乾燥装置と乾燥量の関係等により異なり一律には定められないが、次の要項により実験的に定めることができる。すなわち、最初乾燥の乾燥速度で全工程を乾燥して、適する緩慢

-10-

-411-

な乾燥速度を求め、次に、途中で乾燥速度を速くしてもよい時期を求めればよいのである。もちろん作業効率をさほど問題としないで、全工程を緩慢な速度で乾燥することはこの発明の趣意に含まれる緩慢な乾燥速度は、1時間あたりの含水率の低下でいって、一般的には0.5より遅いことが必要であるが、担体の状態に依存するところもあって、保水性の強い担体の場合で、粉状のものは1時間に0.3以下の含水率の低下、粒徑2mm程度の顆粒状のものは1時間に0.25以下の含水率の低下より遅くないことが概して必要である。担体耐薬剤の品質上最も好ましい緩慢さは一般的に0.1の低下より遅い範囲にある。

この発明で、乾燥方法は、先の提案と重複する手段（修正手段）による場合を除き、上述のような緩慢な乾燥速度に制御が可能である手段、すなわち、水和した酵素と担体から水を緩慢な速度で取り去ることのできる手段を包含するが、当業者に容易に理解される通り、これらは乾燥のための担体との接触を伴うのが通常である。担体が製

-11-

断くして、乾燥した系においてエステル交換活性を呈しない酵素に、該活性を賦与でき、或いは弱い活性を増大させ、従来の酵素剤には認められなかった低水分乃至乾燥した系でのエステル交換高活性の酵素剤が得られるのである。因みに、本発明者らの確認している範囲内において、市販リパーゼを担体と一体的に水和し、リパーゼ活性を維持させることのできる急速な乾燥方法ではKr値が0.005以上も増大することができなかった。先に提案した方法及び本願発明における緩慢な初期速度による乾燥の効果は意外である。

以下この発明を実施例で説明する。

実施例1

市販リパーゼ（リゾブス・ニベウス製）1部を冷水35部に分散し、この分散物にカオリナイト25部をさらに分散することにより、リパーゼ及びカオリナイトを水和した。これをカラムに充填し、カラム中に20℃、湿度50%の空気をSV1100(/hr)で通過させることにより、72時間で水分30%の酵素剤を得た。

-13-

体の場合、空気、酸素、或いはその他の不活性気体を使用され、所謂、通風乾燥、送風乾燥、通気乾燥、熱風乾燥等の技術が利用でき、流体が流体の場合、グリセリン、プロピレングリコール、ソルビット、等のように蛋白質を変性せず且つ水と一定の相溶性ある流体等を用いることができる。乾燥速度を制御する手段としては、流体に用いる流体との飽和を調節する（該流体中の水分を調節する）方法や、流体の被乾燥物表面での流動状態を調節する（流速を調節する）、乾燥流体または被乾燥物に与える熱エネルギーを調整する方法などがあげられる。しかし乾燥時の熱供給は、被乾燥物の温度が上昇して酵素が失活するような過剰を避けるべきであるのは当然で、乾燥初期において温度は通常50℃以下が好ましい。

乾燥の程度は、酵素剤製品を利用する目的により異なるが、一般には水分10%程度以下がよく、特に製品を水分の低い系中で使用するには例えば水分2%以下にするなど、より低下させるのが好ましい。

-12-

比較として湿度0%、温度20℃の乾燥空気をSV1200/hrで同様カラム中を通過させる場合も行ったが、これは水分3%の酵素剤とするのに約4時間であった。

結果は下表の通り

| 酵素剤 | 酯化分解活性(%) | Ka | Kr $\times 10^3$ |
|----------|-------------|------|------------------|
| 市販酵素そのまま | 3000 | 0 | 0 |
| 本例乾燥品 | 800 (26.3%) | 26.0 | 32.5 |
| 比較乾燥品 | 850 (28.2%) | 2.9 | 3.4 |

(*)内は活性率、45mlE担体1g当たりで換算。

実施例2

乾燥開始から24時間経過後通気量を上げてSV4400/hrにする速い乾燥速度で24時間乾燥を継続する他は実施例1と同様に乾燥酵素剤を得た。Kr値は317 $\times 10^3$ であった。

実施例3

ポリビニルアルコール2grをブロムシアナイドでシアニ化し、水洗後0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)50mlと市販リパーゼ（リゾブス・ニベウス製）5grを加え、5℃において一夜攪拌後、ろ過し、

-14-

これを実施例1と同じ方法で乾燥して水分2.5%の
 粉末剤を得た。このもののK_r値は 2.88×10^{-7} であ
 った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.